

## TRANSLATION FROM JAPANESE

- (19) JAPANESE PATENT OFFICE (JP)  
(11) Unexamined Patent Application (Kokai) No. **61-194035**  
(12) Unexamined Patent Gazette (A)
- (51) Int. Cl.<sup>4</sup>: Identification Symbol : JPO File No.:  
A61K 39/395 8214-4C
- (43) Disclosure Date: Aug. 28, 1986  
Request for Examination: Not filed  
Number of Inventions: 1 (5 pages total [in original])
- (54) Title of the Invention:  **$\gamma$ -Globulin preparation**  
(21) Application No. 60-104679  
(22) Filing Date: Feb. 21, 1985  
(62) Division of Application No. 60-33335
- (72) Inventor: HIRAO Yutaka  
(72) Inventor: URYU Katsuhiro  
(72) Inventor: UEMURA Yahiro  
(71) Applicant: THE GREEN CROSS CORP.  
(74) Agent: TAKASHIMA Hajime, Patent Attorney

## **SPECIFICATION**

### **1. Title of the Invention**

$\gamma$ -Globulin preparation

### **2 Claims**

- (1) A heat treated  $\gamma$ -globulin preparation.
- (2)  $\gamma$ -Globulin preparation according to claim 1 subjected to heat treatment in the presence of a stabilizing agent.
- (3)  $\gamma$ -Globulin preparation according to claim 2 wherein said stabilizing agent is at least one [compound] selected from monosaccharides, disaccharides, and sugar alcohols.
- (4)  $\gamma$ -Globulin preparation according to claim 1 wherein heat treatment is carried out at 60°C for 10 hours.
- (5)  $\gamma$ -Globulin preparation according to claim 1 wherein an auxiliary stabilizing agent consisting of at least one [compound] selected from neutral amino acids, neutral salts, C3-10 organic carboxylic acid salts, and surfactants is added in addition to said stabilizing agent.

### **3 Detailed Description of the Invention**

(Field of Industrial Utilization)

The present invention relates to a heat treated  $\gamma$ -globulin preparation.

More specifically, it relates to stabilized  $\gamma$ -globulin that when subjected to low temperature sterilization (60°C, 10 hours), optionally in the presence of an added stabilizing agent, exhibits no increase in polymer [content] or rise in anticomplement activity.

(Prior Art)

Immunoglobulins, which are a class of serum proteins, and particularly  $\gamma$ -globulin preparations containing mostly IgG, have been widely used to date for preventing and treating infectious diseases of various kinds, but are not without drawbacks, such as lacking thermal stability, and containing a wide range of antibodies to multiple viruses and bacteria, for which reason such preparations are commonly sterilized by filtration. However, when  $\gamma$ -globulin is obtained from serum protein fractions, there exists a possibility that extremely small foreign viruses, such as hepatitis viruses or the AIDS virus, can pass through filter pores, so that it cannot be 100% certain that the  $\gamma$ -globulin is free of [such viruses].

For vaccines, which are also serum proteins, a method of heating to 60°C -120°C in the presence of a stabilizing agent has been used in the past with successful results.

(Problem the Invention Attempts to Solve)

It is an object of the present invention to provide a  $\gamma$ -globulin preparation in which foreign viruses of concern have been deactivated.

(Means for Solving the Problem)

As a result of extensive research, the inventors discovered an excellent method for deactivating foreign viruses in  $\gamma$ -globulin, preferably aqueous solutions thereof, the foreign virus deactivation method consisting of heat treatment conducted at 60°C for 10 hours; and that addition of at least one [compound] selected from monosaccharides, disaccharides, and sugar alcohols markedly increases the thermal stability to heat treatment of  $\gamma$ -globulin; it was further discovered that the presence of an auxiliary stabilizing agent consisting of at least one [compound] selected from neutral amino acids, neutral salts, organic carboxylic acid salts, and surfactants in addition to the aforementioned stabilizing agent further increases the thermal stability to heat treatment of  $\gamma$ -globulin, which discoveries led to the present invention.

Additionally, according to the preparation of the invention,  $\gamma$ -globulin can be obtained in isolated monomer form through heat treatment.

Specifically, the invention relates to a heat treated  $\gamma$ -globulin preparation.

In the present invention,  $\gamma$ -globulin is preferably subjected to heat treatment in the form of an aqueous solution containing it. The  $\gamma$ -globulin aqueous solution may consist of  $\gamma$ -globulin aqueous solution at any stage ranging from an unpurified aqueous solution to a purified aqueous solution containing  $\gamma$ -globulin; aqueous solution in a partially purified or purified stage is advantageous for heat treatment. Protein ( $\gamma$ -globulin) content of the solution is preferably 0.1 -30% (w/v). Solution pH is typically from 4.5 to 10, preferably adjusted to pH 6 -8 with a buffering agent.

As regards stabilizing agents for addition to the  $\gamma$ -globulin aqueous solution herein, nonlimiting examples are monosaccharides such as glucose, mannose, galactose, and fructose; disaccharides such as sucrose, maltose, and lactose; and sugar alcohols such as mannitol, sorbitol, and xylitol. Additive amounts of stabilizer range from 10 to 100 g per 100 mL of  $\gamma$ -globulin aqueous solution.

As regards auxiliary stabilizing agents for use herein, examples are neutral salts such as sodium chloride, potassium chloride, magnesium chloride, and other such halide salts of alkali metals or alkaline earth metals, additive amounts thereof being from 0.1 to 10 g per 100 mL of  $\gamma$ -globulin aqueous solution.

Exemplary neutral amino acids include glycine, alanine, valine, leucine, and isoleucine, additive amounts thereof being from 0.1 to 20 g per 100 mL of  $\gamma$ -globulin aqueous solution.

Organic carboxylic acid refers herein to those having a hydrocarbon radical substituted with the carboxyl group; the hydrocarbons may be either saturated or unsaturated, and of either chain (straight chain or branched) or cyclic configuration. Exemplary hydrocarbon radicals are alkyl and aryl (e.g. phenyl). More than one carboxyl moiety may be present in the organic carboxylic acid [molecule], but one or two is preferred. The organic carboxylic acid may also have a hydroxyl substituent. Organic carboxylic acid salts may be selected from among any of the physiologically acceptable salts; preferred are alkali metal salts (e.g. sodium, potassium etc.) and alkaline earth metal salts (e.g. calcium etc.), with sodium and potassium being especially preferred.

Specific examples of organic carboxylic acid salts include physiologically acceptable salts, preferably alkali metal salts (sodium, potassium), of propanoic acid, butanoic acid, pentanoic acid, capric acid, caproic acid, malonic acid, succinic acid, glutaric acid, adipic acid, citric acid, mandelic acid, and the like.

The organic acid will preferably have a carbon number of about 3 -15.

Additive amounts of organic carboxylic acid salts range from 1 to 30 g per 100 mL of  $\gamma$ -globulin aqueous solution.

Exemplary surfactants include alkyl phenyl polyoxyethylene (e.g. TRITON (R) and NONIDET(R)) and other such nonionics; bile acid salts (e.g. sodium taurocholate) and other such anionics; benzalkonium chloride and other cationics; propylene oxide low molecular weight polymers and other polyhydric alcohols having surfactant activity (e.g. PLURONIC (R)), and so on. Additive amounts thereof range from 0.002 to 0.05 g per 100 mL of  $\gamma$ -globulin aqueous solution.

Heat treatment is conducted at a temperature and duration sufficient to deactivate any foreign viruses, for example, 50°C to 130°C, preferably about 60°C, for 25 minutes to 20 hours, preferably 10 hours.

To investigate the thermal effects of the invention, the thermal effects on infectiousness of viruses of various kinds possibly present in  $\gamma$ -globulin preparations were tested. For the experiments,  $\gamma$ -globulin specimens were contaminated with smallpox virus, mumps virus, measles virus, vesicular stomatitis virus, chitangunya [sic; chikungunya?] virus, polio virus, cotasackie [sic; coxsackie?] virus, and echovirus, subjected to heat treatment at 60°C for 10 hours, and the infectiousness of the virus remaining after time measured; regardless of whether or not a stabilizing was added after 10 hours, infectiousness was completely eliminated. This result suggests that heat

treatment conducted in accordance with the invention will deactivate infectiousness of viruses other than those used here as well.

[ $\gamma$ -Globulin preparations subjected to] heat treatment according to the invention were [examined as to] appearance and qualities, as well as quantitative determination of polymer [content], measurement of anticomplement activity, measurement of measles antibody activity, and acute toxicity tests, which showed that the  $\gamma$ -globulin preparations were medically highly safe and effective.

Preparations are typically provided in solution form; where highly purified  $\gamma$ -globulin is used as starting material, the solution can be used as-prepared, or where a crude product is used, the solution can be treated according to purification techniques known in the art, and optionally to dialysis or sterile filtration, and aliquoted into packaged units containing from 500 to 10,000 mg of  $\gamma$ -globulin. No particular method of storage is required provided that high temperature is avoided, but preparations will preferably be stored at 30°C or below, or optionally lyophilized.

The treated  $\gamma$ -globulin, either as-prepared or purified using known techniques, can be administered in a form diluted or dissolved in distilled water for injection. The administered amount for an adult is typically 500 -3000 mg amount, per dose as  $\gamma$ -globulin, and for a child a 250 -1500 mg amount, per dose as  $\gamma$ -globulin.

#### Test Methods:

Since turbidity would be a problem, appearance was evaluated by measuring absorbance at O.D.<sub>600</sub> nm.

Polymer content was analyzed using high performance liquid chromatography.

Anticomplement activity was measured according to the method of Kabat and Meyer (Experimental Immunochemistry), 225, (1961) and the method of Nishioka and Okada (Meneki no Seikagaku, 103, (1971) Kyoritsu Shuppan). Specifically, the decrease in units with addition of 100 units of complement to a specimen was measured, and the decrease in units was designated as the anticomplement activity.

Measles antibody activity was measured by the hemagglutination inhibition test, and is expressed in International Units (IU/150 mg).

#### Example 1

A test was performed to verify the stabilizing action provided by the invention. For the test,  $\gamma$ -globulin with approximately 30% polymer content was prepared to 5% concentration. After adding [one of] several stabilizing agents (additive amounts are given in the table), specimens were heat treated at 60°C for 10 hours, followed by measurement of solution turbidity (O.D.<sub>600</sub> nm), polymer quantitative analysis, and

anticomplement activity measurement. Results showed increased stability of  $\gamma$ -globulin to heat treatment with addition of a stabilizing agent (Table 1).

A drop in polymer, particularly dimer, [content] was noted.

#### Example 2

Solutions of  $\gamma$ -globulin with approximately 20% polymer content containing glucose added in varying concentration and prepared to 5%  $\gamma$ -globulin concentration were heat treated at 60°C, followed by measurement over time of O.D.<sub>600</sub> nm, polymer quantitative analysis, and anticomplement activity measurement.

Systems containing added glucose showed higher  $\gamma$ -globulin stability with increasing amounts [of glucose]. A system containing 100 g glucose did not cloud when subjected to heat treatment at 60°C for 10 hours, and no drop in measles antibody activity was observed. Dimer content dropped to a mere 10%, and anticomplement activity declined by 19 units (Table 2).

#### Example 3

Adding a glucose stabilizing agent and an auxiliary stabilizing agent consisting of a neutral amino acid (glycine), neutral salt (sodium chloride), organic carboxylic acid salt (sodium citrate) or surfactant (PLURONIC(R) F68), stability of  $\gamma$ -globulin with heat treatment at 60°C was evaluated. As in Example 1, tests were conducted with  $\gamma$ -globulin solution containing about 15% polymer.

Systems containing 75 g added glucose per 100 mL of  $\gamma$ -globulin aqueous solution and, as an auxiliary stabilizing agent, sodium chloride 5.8%, glycine 5%, sodium citrate 10%, PLURONIC F68 0.01%, and sodium chloride 5.8% + PLURONIC F68 0.01% were subjected to heat treatment at 60°C. Results are given in Table 3. Addition of an auxiliary stabilizing agent afforded further reductions in polymer content and anticomplement activity.

#### Example 4

Acute toxicity test were conducted by way of safety tests.

Samples A, B, C, D, E, and F subjected to heat treatment at 60°C, 10 hours per Example 3 were thoroughly dialyzed with sterile physiological saline, and administered to mice through the coccygeal vein in total amounts of 0.5 mL and 1.0 mL per animal. The animals were observed for 7 days; no abnormalities were noted.

Table 1

Stabilizer	Amount*1	O.D. <sub>600</sub> nm	Polymer (%)		Anticompliment activity (units)
			Dimer	Polymer	
control	(before heating)	0.024	33	2	54
glucose	50	0.010	15	2	38
sucrose	50	0.012	13	2	36
mannitol	20	0.017	17	2	42

\*1: amount (g) per 100 mL of 5 w/v%  $\gamma$ -globulin solution.

\*2: not measurable

Table 2

Added glucose amount (g)	O.D. <sub>600</sub> nm	Polymer (%)		Anticompliment activity (units)	Measles antibody activity (IU)
		Dimer	Polymer		
control (before heating)	0.024	22	3	54	42
25	0.040	15	30	>50	<10.5
50	0.010	13	3	36	21
75	0.004	12	2	28	40
100	0.004	10	2	19	40

\*1: not measurable

Table 3

Auxiliary stabilizer	Amount (g)	O.D. <sub>600</sub> nm	Polymer (%)		Anticompliment activity (units)	Measles antibody activity (IU)
			Dimer	Polymer		
control	(before heating)	0.004	15	2	44	42
none		0.004	8	1	28	40
sodium chloride	5.8	0.004	5	1	18	42
glycine	5	0.006	8	2	25	45
sodium citrate	10	0.004	8	1	24	38
PLURONIC F68	0.01	0.004	6	1	13	40
sodium citrate + PLURONIC F68	5.8 0.01	0.004	6	1	12	41

Procedural Amendment (voluntary)

Aug. 1, 1985

To the Patent Office Commissioner

1. Designation of Case

Patent Application 60-104679

2. Title of the Invention

$\gamma$ -Globulin preparation

3. Amendant

Relationship to case Applicant

THE GREEN CROSS CORP.

4. Agent

TAKASHIMA Hajime, Patent Attorney

5. Object of amendment(s)

Detailed Description of the Invention in the Specification

7. Description of amendment(s)

(1) On p. 9, line 8 of the Specification, "500 -3000" is corrected to "2500 -3000".

(2) On p. 9, line 9, "250 -1500 mg amount " is corrected to "100 -150 mg/kg body weight".

(3) On p. 12, line 1, "PLURONIC F68" is corrected to "PLURONIC(R) F68".

(4) On p. 12, line 2, "PLURONIC F68" is corrected to "PLURONIC(R) F68".

(5) On. pp. 13 -14, Table 3

PLURONIC F68
sodium citrate + PLURONIC F68

is corrected to

PLURONIC (R) F68
sodium citrate + PLURONIC (R) F68



## ⑫ 公開特許公報(A)

昭61-194035

⑪ Int. Cl.<sup>4</sup>  
A 61 K 39/395識別記号 庁内整理番号  
8214-4C

⑬ 公開 昭和61年(1986)8月28日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 γ-グロブリン製剤

⑮ 特 願 昭60-104679

⑯ 出 願 昭60(1985)2月21日

⑰ 特 願 昭60-33335の分割

⑱ 発 明 者 平 尾 豊 豊中市寺内2-14-1606号  
⑱ 発 明 者 瓜 生 勝 寛 桜井市大福中津道3丁目601-32  
⑱ 発 明 者 上 村 八 尋 枚方市三矢町5-18 メゾン枚方215  
⑲ 出 願 人 株式会社 ミドリ十字 大阪市東区今橋1丁目15番地の1  
⑳ 代 理 人 弁理士 高 島 一

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

γ-グロブリン製剤

## 2. 特許請求の範囲

(1) 加熱処理されてなるγ-グロブリン製剤。

(2) 安定化剤の存在下に加熱処理することを特徴とする特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。

(3) 安定化剤が単糖類、二糖類、糖アルコールから選ばれた少なくとも一種である特許請求の範囲第(2)項記載の製剤。

(4) 加熱処理が、60℃、10時間処理である特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。

(5) 上記安定化剤に加えて、中性アミノ酸、中性塩、炭素原子数3~10の有機カルボン酸塩、界面活性剤より選ばれた少なくとも一種の補助安定化剤を添加する特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、加熱処理してなるγ-グロブリン製

剤に関する。

更に詳しくは、γ-グロブリンに、所望により安定化剤を添加し、低温殺菌(60℃、10時間)した場合、重合体の増加、抗補体価の上昇を認めない安定なγ-グロブリン製剤に関する。

(従来の技術)

血漿蛋白成分である免疫グロブリンの内、特にIgGを主成分とするγ-グロブリン製剤は、これまで広く各種感染症の予防並びに治療に役立てられてきたが、熱安定性に欠けること、多種ウィルス、細菌等の抗体を広く含有している等の理由で濾過による除菌方法がとられている。しかし、γ-グロブリンを血漿蛋白の分画から得る場合には、肝炎ウィルスやエイズウィルス等の極微小サイズの夾雑ウィルスはフィルター孔を通過することが可能であり、得たγ-グロブリン中に混在することは100%否定することはできない。

一方、血漿蛋白成分であるワクチンでは、安定剤の存在下に60℃ないし120℃に加熱する方法がすでに使用されており、成果をあげている。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明の目的は、夾雑を危険されるウィルスの不活化された $\gamma$ -グロブリン製剤を提供することである。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、種々検討を重ね、 $\gamma$ -グロブリン、好ましくはその水溶液に対して、夾雑ウィルスの不活化方法として、60℃、10時間の加熱処理を施すことが非常に優れた夾雑ウィルス不活化方法であり、さらに、単糖類、二糖類および糖アルコールから選ばれる少なくとも一種を添加すれば加熱処理に対する $\gamma$ -グロブリンの熱安定性が著しく高まることを見出すと共に上記安定化剤に加えてさらに中性アミノ酸、中性塩、界面活性剤、有機カルボン酸塩から選ばれる少なくとも一種を共存させることによって $\gamma$ -グロブリンの熱安定性がより一層高められることを見出し、本発明を完成した。

また、本発明の製剤では加熱処理することにより $\gamma$ -グロブリンを単量体に溶解した状態で得る

ものではない。当該安定化剤の添加量は、 $\gamma$ -グロブリン水溶液100ml当たり10～100gである。

本発明で使用する補助安定化剤に関して、中性塩としては塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウムなどのアルカリ金属またはアルカリ土類金属のハロゲン酸塩などが例示され、添加量は、 $\gamma$ -グロブリン水溶液100ml当たり0.1～10gである。

中性アミノ酸(即ち、モノアミノモノカルボン酸)としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンなどが例示され、添加量は、 $\gamma$ -グロブリン水溶液100ml当たり1～20gである。

有機カルボン酸としては、炭化水素残基にカルボキシル基が置換したものをいい、炭化水素残基は飽和されていても不飽和であってもよく、また環状(直鎖状または分枝状)、環状のいずれでもよい。当該炭化水素残基としてはアルキル基、アリール基(たとえばフェニル基)などが例示され

こともできる。

即ち、本発明は、加熱処理されてなる $\gamma$ -グロブリン製剤に関する。

本発明においては、 $\gamma$ -グロブリン含有水溶液の状態で加熱処理に付することが好ましい。 $\gamma$ -グロブリン含有水溶液としては、 $\gamma$ -グロブリンを含む未精製な水溶液から精製された水溶液までいかなる段階の $\gamma$ -グロブリン水溶液であってもよいが、有利には部分精製または精製段階の水溶液が加熱処理の対象とされる。その蛋白質( $\gamma$ -グロブリン)の含量は0.1～30%(w/v)のものが好ましい。また、当該水溶液のpHは一般にpH4.5～10であり、好ましくは適当な緩衝液によってpH6～8に調整されることが好ましい。

$\gamma$ -グロブリン含有水溶液に加えられる安定化剤に関して、単糖類としてはグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等が、二糖類としてはショ糖、麦芽糖、乳糖等が、糖アルコールとしてはマンニット、ソルビット、キシリット等が好適なものとして例示されるが、これらに限定される

る。当該有機カルボン酸におけるカルボキシル基は複数個であってもよいが、1および2個が好ましい。また当該有機カルボン酸は、水酸基で置換されていてもよい。有機カルボン酸塩における塩としては、生理的に許容されるものであれば特に制限はなく、好ましいものとしては、アルカリ金属塩(ナトリウム塩、カリウム塩など)、アルカリ土類金属塩(カルシウム塩など)、特に好ましくは、ナトリウム塩、カリウム塩があげられる。

有機カルボン酸塩の具体例としては、プロパン酸、ブタン酸、ペンタン酸、カブリン酸、カブロン酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、クエン酸、マンデル酸などの生理的に許容される塩、特にアルカリ金属塩(ナトリウム塩、カリウム塩)があげられる。

かかる有機酸の好ましい炭素数は、3～15程度である。

有機カルボン酸塩の添加量は、 $\gamma$ -グロブリン水溶液100ml当たり1～30gである。

界面活性剤としては、アルキルフェニルポリオ

キシエチレン(例えばトリトン登録商標(Triton®)及びノニデット登録商標(Nonidet®))のような非イオン性剤、胆汁酸塩(例えばナトリウムタウロコラート)のようなアニオン性剤、又ベンズアルコニウムクロライドのようなカチオン性剤、プロピレンオキシドの高分子量共重合体のような界面活性を持つ多価アルコール(プルロニック登録商標(Pluronic®) F68)などが例示され、その添加量は、 $\gamma$ -グロブリン水溶液100ml当たり0.002~0.05g程度が好ましい。

加熱処理は、夾雑ウィルスを不活化するに十分な温度および時間行えばよく、たとえば50℃~130℃、好ましくは約60℃にて25分~20時間、好ましくは10時間行われる。

本発明の加熱効果を検討するため、 $\gamma$ -グロブリン製剤に含まれる可能性が危惧される各種ウィルスの感染性について、加熱効果を実験した。この実験は、 $\gamma$ -グロブリン試料に痘苗ウィルス、おたふくかぜウィルス、はしかウィルス、水疱性口内炎ウィルス、チタングニアウィルス、ポリオ

ものではないが、特に望ましくは、30℃以下に保存することであるが、また、これは所望により凍結乾燥製剤としてもよい。

当該処理を経た $\gamma$ -グロブリンは、そのまま、または自体公知の製剤化処理を行って、例えば注射用蒸留水で希釈又は溶解して投与される。投与量は、通常、成人に対しては1回に $\gamma$ -グロブリンとして、500~3000mg量、小児に対しては、1回に $\gamma$ -グロブリンとして、250~1500mg量が使用される。

#### 試験方法：

外観性状としては、濁りが問題となることからO.D. ... nmの吸光度を測定した。

重合体の定量は高速液体クロマトグラフィーで分析した。

抗補体価の測定は、カバットとマイヤーの方法(エクスペリメンタル イムノケミストリ(Experimental Immunochestry), 225, (1961))及び西岡、岡田の方法(免疫の生化学, 103, 昭46(共立出版))の方法に準じた。すなわち、100単位

ウィルス、コタツキーウィルス、エコーウィルスを加え、60℃で10時間の加熱処理を行い、経時的に残存するウィルス感染性を測定したが、10時間後には安定化剤の添加、不添加に係わらず、感染性を完全に失っていた。この結果は用いたウィルス以外のウィルスについても本発明の加熱処理が施されるならば感染性は失活させることを示唆するものである。

本発明は上記加熱処理を行った後、外観、性状はもとより、重合体の定量、抗補体価の測定、麻疹抗体価の測定および急性毒性実験を行い、 $\gamma$ -グロブリン製剤として医療上極めて安全性の高いまた、有効性の高いものといえる。

かくして得られた製剤は、一般に溶液状であり、高度精製 $\gamma$ -グロブリンを出発材料とした場合はそのまま、粗製品を用いた場合は公知の精製法に準じて処理を行った後、必要ならば、透析、除菌濾過を行った後、包装単位に従って500~10,000mgの $\gamma$ -グロブリンを含むように分注される。貯蔵方法としては、高温を避ければ特に限定される

の補体が試料を加えることによって何単位に減少するかを測定し、その減少単位を抗補体価として表わした。

麻疹抗体価はヘマグルチネーション インヒビション テスト(Hemagglutination Inhibition test)法により測定し、国際単位(IU/150mg)で表わした。

#### 実施例1

本発明による安定化効果を確認するための実験を行った。実験には重合体を約30%含む $\gamma$ -グロブリンを5%濃度に調整して行った。各種安定化剤を添加後(添加量は表中に明記)、60℃、10時間の加熱処理を行い、溶液の濁り(O.D. ... nm)、重合体の定量および抗補体価を調べた。この結果、安定化剤を添加することによって $\gamma$ -グロブリンの加熱安定性は増大した(表1)。

また、重合体特に2量体の低下が確認された。

#### 実施例2

重合体を約20%含む $\gamma$ -グロブリン溶液に各種濃度にグルコースを添加、 $\gamma$ -グロブリン濃度

を5%に調整したものにつき60℃で加熱処理を行い、経時的にO.D.値、重合体定量、抗補体価、麻疹抗体価等の測定を行った。

グルコースを加えた系では、加えた量が増すに伴いγ-グロブリンの安定性が高まった。100gグルコース添加の系では60℃、10時間加熱においても全く白濁せず、麻疹抗体価の減少も見られなかった。しかもダイマーもわずかに10%に低下し、抗補体価も19単位と低下した(表2)。

#### 実施例3

安定化剤であるグルコースに補助安定化剤である中性アミノ酸(グリシン)、中性塩(塩化ナトリウム)、有機カルボン酸塩(クエン酸ナトリウム)、界面活性剤(ブルニック®F68)等を加え、60℃で加熱処理におけるγ-グロブリンの安定性につき調べた。実施例1と同様重合体を約15%含むγ-グロブリン溶液で行った。

グルコース添加量をγ-グロブリン水溶液100ml当たり75gとし、塩化ナトリウム5.8%添加、グリシン5%添加、クエン酸ナトリウム10%添

加、ブルニックF68 0.01%添加および塩化ナトリウム5.8%とブルニックF68 0.01%両補助安定化剤添加の各系について60℃で加熱処理を施した。結果は表3に示す。補助安定化剤を添加することによって重合体および抗補体価をさらに低下させることができた。

#### 実施例4

安全性試験として急性毒性実験を行った。

実施例3で60℃、10時間加熱処理を施したサンプルA、B、C、D、E、Fにつき無菌生理的食塩水で十分透析した後、マウスの尾静脈から1匹当たり総量0.5mlおよび1.0mlをそれぞれ1群5匹に投与し、7日間観察したが、異常は認められなかった。

(以下余白)

表1

安定化剤	添加量**	O.D.値 nm	重合体(X)		抗補体価 (単位)
			ダイマー	ポリマー	
コントロール	(加熱前)	0.024	33	2	54
グルコース	50	0.010	15	2	38
シロ糖	50	0.012	13	2	36
マンニット	20	0.017	17	2	42

\*: γ-グロブリンの5w/v%溶液100ml当たりの添加量(g)  
\*\*: 測定不可能

表2 (60℃、10時間加熱処理)

グルコース添加量 (g)	O.D.値 nm	重合体(X)		抗補体価 (単位)	麻疹抗体価 (IU)
		ダイマー	ポリマー		
コントロール (加熱前)	0.024	22	3	54	42
25	0.040	15	30	>50	<10.5
50	0.010	13	3	36	21
75	0.004	12	2	28	40
100	0.004	10	2	19	40

\*: 測定不可能

表3

補助安定化剤	添加量 (g)	O.D.値 nm	重合体(X)		抗補体価 (単位)	麻疹抗体価 (IU)
			ダイマー	ポリマー		
コントロール	(加熱前)	0.004	15	2	44	42
無添加		0.004	8	1	28	40
塩化ナトリウム	5.8	0.004	5	1	18	42
グリシン	5	0.006	8	2	25	45
クエン酸 ナトリウム	10	0.004	8	1	24	38
ブルニックF68	0.01	0.004	6	1	13	40
塩化ナトリウム ブルニックF68	5.8 0.01	0.004	6	1	12	41

手 続 補 正 書 (自発)

昭和60年8月1日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第104679号

2. 発明の名称

γ-グロブリン製剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名(名称) 株式会社 ミドリ十字

代表者 松 下 隆 蔵

4. 代 理 人 ⑤541

住所 大阪市東区平野町4丁目53番地3

ニューライフ平野町406号

電話(06) 227-1156

高島国際特許事務所

氏名 弁理士(8079) 高 島

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

- (1) 明細書第9頁、第8行の「500~3000」を  
「2500~5000」に訂正する。

- (2) 同書第9頁、第9行の「250~1500mg量」  
を「100~150 mg/kg体重」に訂正する。

- (3) 同書第12頁、第1行の「ブルロニックF68」  
を「ブルロニック・F68」に訂正する。

- (4) 同書第12頁、第2行の「ブルロニックF68」  
を「ブルロニック・F68」に訂正する。

- (5) 同書第13~14頁、表3の

ブルロニックF68
塩化ナトリウム ブルロニックF68

を

ブルロニック・F68
塩化ナトリウム ブルロニック・F68

に訂正する。

以上